



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 196 28 002 C 1

⑥ Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**G 01 N 33/543**  
G 01 N 33/547  
G 01 N 33/533  
G 01 N 33/58  
G 01 N 21/64

⑳ Aktenzeichen: 196 28 002.8-52  
㉑ Anmeldetag: 11. 7. 96  
㉒ Offenlegungstag: —  
㉓ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 18. 12. 97

DE 196 28 002 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

㉔ Patentinhaber:  
Institut für Chemo- und Biosensorik e.V., 48149  
Münster, DE  
㉕ Vertreter:  
PFENNING MEINIG & PARTNER, 80336 München

㉖ Erfinder:  
Katerkamp, Andreas, 48149 Münster, DE

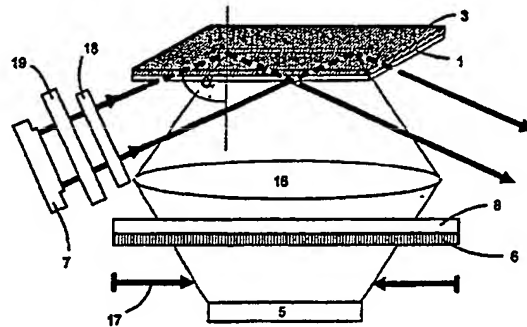
㉗ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

US 39 39 350  
WO 94 27 137  
WO 90 06 503  
WO 90 05 295

BRADLEY, R.A. (u.a.), in: Phil.Trans.R.Soc.Lund.,  
1987, Bd. 316, S. 143-160;  
CHRISTENSEN, D. (u.a.), in: Proc. SPIE-Int.Soc.  
Opt.Eng., Fiber Optic Sensors in Medical Diag-  
nostics, 1993, Bd. 1886, S. 2-8;

㉘ Vorrichtung und Verfahren zur Durchführung von Fluoreszenzimmunotests

㉙ Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Durchführung von insbesondere quantitativen Fluoreszenzimmunotests mittels Evanescentfeldanregung. Dabei können verschiedenste bekannte biochemische Assays von allgemeinen Rezeptor-Ligand-Systemen zugrunde gelegt werden. Bevorzugt werden jedoch Antikörper-Antigen-Systeme bewertet. Dabei sollen mit einer sehr einfach aufgebauten Vorrichtung quantitative Fluoreszenzimmunotests mit verschiedenen bekannten biochemischen Assays durchgeführt werden können. Dazu wird mindestens eine nahezu monochromatisches Licht aussendende Lichtquelle (7, 7'), die Lichtstrahlen mit einer Fluoreszenz eines am Antikörper gebundenen Markierungsstoffes hervorrufoenden Wellenlänge aussendet, verwendet. Die Lichtstrahlen werden in einem durch eine vorgebbare Eindringtiefe  $d$  für das evanescente Feld bestimmten Winkel  $\alpha$  auf eine Grenzfläche (20) zwischen einer optisch transparenten Bodenplatte (1) aus Material, dessen Brechungsindex  $n_1$  größer ist als der Brechungsindex  $n_2$  des Materials oberhalb der Grenzfläche (20) und einem küvettenförmig ausgebildeten Aufnahmebereich (2) für die Probe gerichtet. Der Aufnahmebereich (2) ist auf der entgegengesetzt zur Bodenplatte (1) angeordneten Seite mit einer Deckplatte (3) abgedeckt und ein Detektor (5) zur Erfassung des Fluoreszenzlichtes ist gleichseitig zur Bodenplatte (1), wie die Lichtquelle (7) angeordnet.



BEST AVAILABLE COPY

DE 196 28 002 C 1

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung von insbesondere quantitativen Fluoreszenzimmunotests mittels Evanescentfeldanregung. Dabei können verschiedenste bekannte biochemische Assays von allgemeinen Rezeptor-Ligand Systemen, wie z. B. Antikörper-Antigen, Lectin-Kohlenhydrat, DNA oder RNA-komplementäre Nukleinsäure, DNA oder RNA-Protein, Hormonrezeptor, Enzym-Enzymcofaktoren, Protein G oder Protein A-Immunglobulin oder Avidin-Biotin zugrunde gelegt werden. Bevorzugt werden jedoch Antikörper-Antigen Systeme bewertet.

Fluoreszenzimmunotests oder auch Fluoreszenzimmunosenoren werden üblicherweise bereits seit längerer Zeit eingesetzt und sie dienen dazu, hauptsächlich in einer flüssigen Probenmatrix eine unbekannte Menge einer bestimmten chemischen oder biochemischen Substanz zu quantifizieren. Dabei werden Antikörper selektiv an die zu bestimmende Substanz gebunden. Die zu bestimmende Substanz wird vom Fachmann auch als Antigen bezeichnet. Bei den Fluoreszenzimmunotests werden die analytspezifischen Antikörper mit einem Markierungsstoff markiert, der bei einer bestimmten stoffspezifischen Wellenlänge  $\lambda_{ex}$  optisch angeregt wird und das Fluoreszenzlicht mit einer anderen Wellenlänge, die in der Regel größer ist, mit einem geeigneten Detektor unter Auswertung der Fluoreszenzlichtintensität genutzt. Die Ausnutzung der Evanescentfeldanregung bei der Durchführung solcher Fluoreszenzimmunotests respektive den Fluoreszenzimmunosenoren gehört bereits zum Stand der Technik.

So sind verschiedene Lösungen bereits in WO 94/27137, von R.A. Badlay, R.A.L. Drake, I.A. Shanks, F.R.S., A.M. Smith und P.R. Stephenson in "Optical biosensors for immunoassays: fluorescence capillary-fill device", Phil. Trans. R. soc. Lond. B 316, 143 bis 160 (1987) und D. Christensen, S. Dyer, D. Fowers and J. Herron, "Analysis of Excitation and Collection Geometries for Planar Waveguide Immunosensors", Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. Vol. 1886, Fiber Optic Sensors in Medical Diagnostics, 2 bis 8 (1993) beschrieben. Die bekannten Lösungen haben jedoch generell den Nachteil, daß sie einen relativ hohen Aufwand erforderlich machen, um das Licht, das zur Erzeugung der Fluoreszenz erforderlich wird, in einen Lichtleiter einzukoppeln bzw. das Fluoreszenzlicht auszukoppeln, die ein wesentlicher Bestandteil für die bisher üblicherweise verwendeten Vorrichtungen sind.

Daneben ist in US 3,939,350 eine Lösung beschrieben, bei der Fluoreszenzimmunoassays mittels Evanescentfeldanregung durchgeführt werden.

Dabei wird Licht einer Lichtquelle in einen Winkel durch ein Prisma auf eine Grenzfläche gerichtet, so daß Totalreflektion auftritt und die hervorgerufene Fluoreszenz in einer Probe mit einem Detektor gemessen werden kann. Das gesamte Probenvolumen ist hierbei in einem abgeschlossenen und abgedichteten Raum aufgenommen, so daß infolge des relativ großen Probenvolumens lediglich eine diffusionskontrollierte Endpunktdektion erfolgen kann, die fehlerbehaftet ist.

In WO 90/05295 ist ein optisches Biosensorsystem beschrieben, bei dem eine aufwendige Optik Anregungslicht auf sensitive Bereiche eines ebenfalls aufwendigen Kanalsystems, durch das Probenvolumen mittels gesteuerten Ventilen und Pumpen geführt wird, gerichtet werden kann und das durch Fenster aus den sensitiven Bereichen austretende Fluoreszenzlicht wieder auf ei-

nen Detektor zur Intensitätsmessung gerichtet werden kann. Neben dem bereits erwähnten nachteiligen komplizierten und aufwendigen Aufbau erfordert dieses System vor bzw. nach Durchführung eines Testes eine Reinigung sowohl der Pumpen, wie auch des gesamten Kanalsystems, um nachfolgende Meßfehler ausschließen zu können.

In WO 90/06503 ist ein Sensor beschrieben, bei dem Anregungslicht in einem geeigneten Winkel durch ein Substrat auf eine Grenzfläche zu einer Pufferschicht gerichtet wird, über der eine zusätzliche Wellenleiterschicht aufgebracht ist, an der wiederum die zu bestimmenden Analyten gebunden werden. Die Probe soll dort in einen Hohlraum durch Kapillarkräfte einführbar sein.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, eine Möglichkeit zu schaffen, mit einer sehr einfach aufgebauten Vorrichtung quantitative Fluoreszenzimmunotests mit verschiedenen bekannten biochemischen Assays durchzuführen zu können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 enthaltenen Merkmale für die Vorrichtung und den Merkmalen des Anspruchs 19 für das Verfahren gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungsformen und Weiterbildungen der Erfindung ergeben sich mit der Verwendung der in den untergeordneten Ansprüchen enthaltenen Merkmale.

Mit der erfindungsgemäß ausgebildeten Vorrichtung können Fluoreszenzimmunotests in verschiedenen Prozeßabläufen (Assays) durchgeführt werden. So besteht einmal die Möglichkeit der Durchführung von kompetitiven Assays, und es können aber auch Sandwichassays und andere bekannte Assayformen genutzt werden.

Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird ähnlich gearbeitet, wie dies bereits im Stand der Technik bekannt ist. Dabei wird als Markierungsstoff ein Fluorophor verwendet und mit diesen analytspezifischen Antikörper markiert. Der gebundene Fluorophor wird mit einer Evanescentfeldanregung angeregt und die Fluoreszenzintensität, die dadurch hervorgerufen worden ist, ermöglicht die Quantifizierung der markierten Antikörper, und so wird auch der Analyt quantifizierbar.

Bei der Vorrichtung nach der Erfindung wird Licht einer Lichtquelle unter einem Winkel  $\alpha$  auf die Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex gerichtet. Dabei wird eine Lichtquelle ausgewählt, die nahezu monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge aussendet, die geeignet ist, den Markierungsstoff, in diesem Fall das Fluorophor, anzuregen. Als Lichtquelle eignen sich dabei insbesondere Laserdioden, da diese ein geeignetes Strahlprofil und eine ausreichende Lichtleistung, bei kleiner Baugröße und geringem Energieverbrauch aufweisen.

Es können aber auch andere monochromatisches Licht aussendende Lichtquellen Verwendung finden.

Der Winkel  $\alpha$  mit dem das ausgesendete Licht auf die Grenzfläche gesendet wird, bestimmt neben dem Brechungsindex, des im Strahlengang vor der Grenzfläche angeordneten Materials und dem sich daran anschließenden Material gemeinsam mit der Wellenlänge des Lichtes, die Eindringtiefe  $d$  für das evanescente Feld. Dabei muß der Brechungsindex  $n_1$  des Materials, das im Strahlengang vor der Grenzfläche angeordnet ist Totalreflexion an der Grenzfläche ermöglichen und sollte daher größer als der Brechungsindex  $n_2$  des anderen, danach angeordneten Materials sein. Der Winkel  $\alpha$  wird bevorzugt so gewählt, daß gilt:  $\sin(\alpha) > n_2/n_1$ . Wird diese Voraussetzung erfüllt, wird alles Licht an der Grenzfläche reflektiert und somit Totalreflexion er-

reicht. Bei Erfüllung dieser Bedingung, dringt jedoch ein relativ kleiner Teil des Lichts durch die Grenzfläche in das Material, das im Strahlengang nach der Grenzfläche angeordnet ist, ein und das evanescente Feld entsteht. Die Eindringtiefe  $d$  wird dadurch definiert, daß sie der Entfernung von der Grenzfläche entspricht, bei der die Intensität des evaneszenten Feldes auf den Wert 1 durch  $e$  abgefallen ist, wobei  $e$  gleich der Basis des natürlichen Logarithmus ist. Die Eindringtiefe  $d$  läßt sich mit der folgenden Gleichung berechnen:

$$d = \frac{\lambda}{2\pi} \cdot \frac{1}{\sqrt{n_1^2 \sin^2(\alpha) - n_2^2}}$$

Mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 700$  nm, einem Brechungsindex von  $n_1 = 1,51$  und einem Brechungsindex von  $n_2 = 1,34$  wird bei einem Einfallswinkel des Lichtes von  $\alpha = 65^\circ$  eine Eindringtiefe  $d$  von ca. 400 nm und bei einem Einfallswinkel  $\alpha = 80^\circ$  eine Eindringtiefe  $d$  von ca. 173 nm erreicht. Daraus folgt, daß durch das evanescente Feld nur solche Markierungsstoffe optisch angeregt werden können, die sich in unmittelbarer Nähe der Grenzfläche befinden. Für die Durchführung der Fluoreszenzimmunotests ergibt sich daraus, daß ausschließlich die Markierungsstoffe der Antikörper oder Antigene angeregt werden, die auf der Oberfläche der Grenzfläche gebunden sind. Die Fluoreszenzintensität des von diesen Fluorophoren emittierten Lichtes ist damit direkt proportional zur Konzentration der an der Oberfläche gebundenen markierten Antikörper und je nach dem benutzten biochemischen Assay proportional oder umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration.

Die erfindungsgemäß ausgebildete Vorrichtung verwendet nunmehr mindestens eine Lichtquelle, die nahezu monochromatisches Licht aussendet und dieses in einem, die Eindringtiefe  $d$  für das evanescente Feld vorgebenden Winkel  $\alpha$  auf eine für dieses Licht transparente Bodenplatte richtet. Der Brechungsindex  $n_1$  der Bodenplatte sollte größer als 1,33 sein. Auf der anderen Seite der Bodenplatte wird zwischen einer Deckplatte ein küvettenförmig ausgebildeter Aufnahmebereich ausgebildet. Zwischen Bodenplatte und dem küvettenförmig ausgebildeten Aufnahmebereich ist besagte Grenzfläche ausgebildet und das evanescente Feld kann sich mit der vorgegebenen Eindringtiefe  $d$  innerhalb des küvettenförmigen Aufnahmebereiches auf an die Oberfläche gebundenen markierten Antikörpern oder Antigenen auswirken und die als Markierungsstoff verwendeten Fluorophore anregen.

Die so hervorgerufene Fluoreszenz wird mit der entsprechenden Intensität mit einem Detektor gemessen. Der Detektor ist dabei an der gleichen Seite der Bodenplatte, wie die Lichtquelle angeordnet.

Als Detektor kann dabei ein einzelner lichtempfindlicher Detektor, eine lineare oder eine flächenhafte Anordnung von mehreren lichtempfindlichen Detektoren verwendet werden.

Obwohl, bei der Verwendung von Laserdioden das gesendete Licht nahezu monochromatisch ist, wird ein schwacher spektralbreiter Fluoreszenzuntergrund im Laserlicht beobachtet. Aus diesem Grunde wird vorzugsweise zwischen Lichtquelle und Bodenplatte ein schmalbandiger Anregungsfilter angeordnet, der bevorzugt eine Spektralbandbreite  $< 10$  nm hat und nur Licht in diesem engen begrenzten Wellenlängenbereich

angepaßt an die Lichtquelle durchläßt.

Vorteilhaft kann auch ein zweiter relativ breitbandiger Filter (Emissionsfilter) vor dem Detektor angeordnet werden. Dieser Filter verhindert, daß im Material der Bodenplatte und bei der Reflexion an der Grenzfläche gestreutes Licht der Lichtquelle auf den Detektor gelangt und das Meßergebnis verfälscht. Für die beiden Filter bieten sich günstigerweise Interferenzfilter an.

Besonders vorteilhaft ist es, polarisiertes Licht auf die zu bestimmende Probe zu richten. Hierfür kann in den Strahlengang des Lichtes im Anschluß an die Lichtquelle ein Polarisator angeordnet werden.

Bei polarisierter Anregung und Detektion wird in günstigerweise ausgenutzt, daß die Fluorophore der markierten Antikörper, die an der Oberfläche fest gebunden sind, in ihrer Beweglichkeit gehemmt sind. Demzufolge ist deren Fluoreszenzlicht genau wie das Anregungslicht in der gleichen Polarisationssebene ausgerichtet und kann detektiert werden.

Im Gegensatz dazu wird das Fluoreszenzlicht der Fluorophore der Antikörper, die nicht an der Oberfläche gebunden sind und sich demzufolge frei bewegen können, in anderen Polarisationssebenen ausgerichtet sein. Mit der Verwendung von polarisiertem Licht zur Anregung kann das Fluoreszenzlicht der an den Antikörper oder Antigene gebundenen Fluorophore unterdrückt werden, die sich zwar in Reichweite des evaneszenten Feldes befinden, jedoch nicht an die Oberfläche gebunden sind. Der Vorteil der polarisierten Anregung und Detektion wird verständlich, wenn die Abmessungen eines Antikörpers von ca. 10 nm ins Verhältnis zur Eindringtiefe des evaneszenten Feldes bis zu etwa 500 nm betrachtet wird. Die Polarisation bei der Anregung und Detektion, wobei dafür auch vor dem Detektor ein Polarisator angeordnet wird, kann das Verhältnis von Nutzsignal zu Hintergrundsignal verbessern.

Die erfindungsgemäß ausgebildete Vorrichtung weist gegenüber den bisher verwendeten einige wesentliche Vorteile auf. Sie verfügt über einen sehr einfachen Aufbau, der geringe Ansprüche an die zu verwendenden optischen Bauelemente stellt und insbesondere bei der Einkopplung des Lichtes zur Anregung der Fluorophore und/oder bei der Auskopplung des Fluoreszenzlichtes keine gesonderten Anforderungen stellt. Außerdem können die verschiedensten biochemischen Assays ohne weiteres durchgeführt und die wesentlichen Bestandteile kostengünstig hergestellt werden, so daß auch ein einmaliger Gebrauch zumindest von Teilen ohne weiteres möglich ist. Außerdem wird die notwendige Separation der chemischen Komponenten aus dem Probenvolumen, von den an der Oberfläche gebundenen Komponenten, gewährleistet.

Dies wird auch dadurch erreicht, daß Bodenplatte und Deckplatte sowie die dazwischen angeordneten Abstandshalter aus einfachen und kostengünstig beschaffbaren Materialien, die mit Standard-Technologien bearbeitet werden können, bestehen. So können für Boden- und Deckplatte Kunststoffe und für den Abstandshalter in günstiger Form ein biokompatibler Klebefilm eingesetzt werden, der beidseitig haftend ausgebildet ist.

Der Abstandshalter weist eine Dicke von 0,001 bis 10 mm, besonders bevorzugt 50  $\mu$ m auf und bildet durch eine Aussparung den Aufnahmebereich für die Probe aus.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht im wesentlichen darauf, daß ein definiertes Probenvolumen durch den küvettenförmigen Aufnahmebereich geführt und dort einer Evanescentfeldanregung unterzogen wird,

wie dies bereits beschrieben wurde. Das Probenvolumen kann dabei durch Saug- oder Druckwirkung durch den küvettenförmigen Aufnahmebereich geführt werden. Wobei zusätzlich Kapillarkraftwirkung ausgenutzt werden kann.

In einer Deckplatte ist zumindest eine Öffnung vorgesehen, in die ein Probencontainer einsetzbar oder angeordnet ist, dabei ist die Öffnung in der Deckplatte so angeordnet, daß eine Verbindung zwischen Probencontainer und Aufnahmebereich herstellbar ist. Zusätzlich ist eine zweite Öffnung vorhanden, die ebenfalls mit dem küvettenförmigen Aufnahmebereich verbunden ist.

Die zweite Öffnung kann ebenfalls in der Deckplatte vorgesehen sein. An diese zweite Öffnung kann eine externe Pumpe angeschlossen oder eine eigene Pumpe eingesetzt werden. Die eigene Pumpe besteht dabei bevorzugt aus einem zylinderförmigen Hohlkörper, der passend in die zweite Öffnung einsetzbar ist und in dem ein Kolben angeordnet ist, der aus dem zylinderförmigen Hohlkörper zur Erzeugung der Pumpwirkung herausziehbar ist. Am Boden des zylinderförmigen Hohlkörpers kann ein saugfähiges Material, beispielsweise ein Vlies oder Papier angeordnet sein.

Die Erfindung kann man weiter ausbilden, in dem in den bereits bezeichneten Probencontainer eine Hülse einsetzbar ist, die nach unten mit einer Membran abgeschlossen sein kann. Dabei können auf der Membran vorzugsweise Antigene immobilisiert sein und an der Innenwandung der Hülse befinden sich für die Durchführung des Testes erforderliche markierte analytische Antikörper.

Nachfolgend soll die Erfindung beispielhaft näher beschrieben werden.

Dabei zeigt:

Fig. 1 das Meßprinzip eines kompetitiven Assays;

Fig. 2 das Meßprinzip einer Fluoreszenzmessung mit Evanescentfeldanregung von oberflächen gebundenen markierten Antikörpern;

Fig. 3 das Meßprinzip der Durchführung eines Sandwichassays;

Fig. 4 das Prinzip zur Durchführung eines verbesserten kompetitiven Assays;

Fig. 5 einen Teil der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Aufnahme der Probe;

Fig. 6 eine schematische Darstellung einer Ausführungsform einer erfindungsgemäß ausgebildeten Vorrichtung mit einer Lichtquelle;

Fig. 7 eine schematische Darstellung einer zweiten Ausführungsform mit zwei verwendeten Lichtquellen;

Fig. 8 die Anordnung eines Probencontainers und einer Pumpe an der erfindungsgemäßen Vorrichtung und

Fig. 9 eine Weiterbildung der Vorrichtung nach Fig. 8 mit einer zusätzlich einsetzbaren Hülse.

Der Fig. 1 kann schematisch das Meßprinzip für die Durchführung eines kompetitiven Assays entnommen werden.

Eine bekannte Menge Fluorophor markierter analytischer Antikörper Ak wird mit einer unbekannten zu quantifizierenden Menge Antigenen Ag gemischt, dabei muß die Menge der Antikörper Ak größer sein, als die Menge der Antigene Ag. Die markierten analytischen Antikörper Ak binden an die Antigene Ag und, da die Menge der markierten analytischen Antikörper Ak größer als die der Antigene Ag ist, bleiben ungebundene markierte analytische Antikörper Ak über. Das so entstandene Gemisch aus nicht gebundenen bzw. freien markierten analytischen Antikörpern Ak wird mit einer Oberfläche in Kontakt

gebracht, auf der das Antigen Ag immobilisiert wurde. Zur besseren Verdeutlichung ist diese Phase des Assays durch die gestrichelte Linie in der Darstellung getrennt. An die immobilisierten Antigene Ag binden die noch freien markierten analytischen Antikörper Ak an, während die schon gebundenen in der Lösung oberhalb der Oberfläche verbleiben. Die Menge der analytischen Antikörper Ak, die an das auf der Oberfläche immobilisierte Antigen Ag gebunden sind, ist umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration, die nachgewiesen werden soll.

Die Menge, der an der Oberfläche gebundenen markierten analytischen Antikörper Ak kann durch Evanescentfeldanregung und Messung der Fluoreszenzintensität quantifiziert werden.

Dieses Meßprinzip kann der Fig. 2 entnommen werden. Dabei wird durch ein Medium mit dem Brechungsindex  $n_1$ , das später bei der Beschreibung der Fig. 5 bis 9 als Bodenplatte 1 bezeichnet wird, Licht mit einer Wellenlänge, mit der das Fluorophor als Markierungsstoff angeregt werden kann, in einem Winkel  $\alpha$  parallel gegen die als Grenzfläche 20 wirkende Oberfläche, auf der die immobilisierten Antigene gebunden sind, gerichtet. Das Medium mit dem Brechungsindex  $n_1$  ist hier unter der Grenzfläche 20 angeordnet.

An dieser als Grenzfläche 20 dienenden Oberfläche erfolgt Totalreflexion und es bildet sich ein evanescentes Feld oberhalb dieser Oberfläche aus, das die Anregung der Fluorophore bewirkt.

Der Fig. 2 ist dabei auch die Intensität I mit dem Kurvenverlauf 21 des evaneszenten Feldes in Abhängigkeit des Abstandes X von der als Grenzfläche 20 wirkenden Oberfläche dargestellt, wobei eindeutig zu erkennen ist, daß sich die Intensität 21 mit wachsendem Abstand exponentiell verringert.

Der Fig. 3 ist schematisch der Ablauf eines anderen Assayformates, eines sogenannten Sandwichassays zu entnehmen, wobei die Phasen wieder durch die eingezzeichnete gestrichelte Linie getrennt sind. Dabei ist Voraussetzung, daß ein Paar von analytischen Antikörpern Ak existiert, die beide gleichzeitig an das Antigen Ag binden können, ohne daß diese analytischen Antikörper Ak sich gegenseitig behindern. Dabei wird einer der beiden analytischen Antikörper mit einem Fluorophor markiert. Der andere der analytischen Antikörper Ak ist auf einer Oberfläche immobilisiert. Nach der Reaktion und Oberflächenanbindung des zweiten Antikörpers werden die Fluorophore bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge dann angeregt und es wird ein Fluoreszenzsignal erhalten, das bei dieser Form des Immunotests direkt proportional zur Antigenkonzentration ist. Das hat den Vorteil, daß bereits eine kleinere Antigenkonzentration ein erfaßbares Signal erzeugt und auch kleine Änderungen in der Antigenkonzentration empfindlich erkannt werden können.

Demgegenüber hat das bereits beschriebene kompetitive Assay (vergl. Fig. 1) den Nachteil, daß kleine Antigenkonzentrationen bereits ein großes Signal erzeugen und entsprechend kleine Änderungen nur schwer gemessen werden können.

Es ist allgemein bekannt, daß beim Sandwichassay die Nachweisgrenze kleiner und die Empfindlichkeit größer als beim kompetitiven Assay ist. Der Sandwichassay hat aber demgegenüber den Nachteil, daß ein zweiter analytischer Antikörper Ak existieren muß und dies nur dann möglich ist, wenn die Molmasse des Antigens Ag wesentlich größer als 200 Dalton ist. Es können dem-

zufolge niedermolekulare Antigene, wie beispielsweise Umweltschadstoffe so nicht bzw. nur schwer nachgewiesen werden.

Daraus folgt, daß kompetitive Assays universeller einsetzbar sind, jedoch eine geringere Empfindlichkeit haben, wohingegen der Sandwichassay in diesen Punkten zwar besser ist, jedoch nicht in allen Fällen eingesetzt werden kann.

In Fig. 4 ist das Prinzip eines neuartigen Assays beschrieben, wobei hierzu noch nähere Ausführungen, insbesondere für die zu verwendende Vorrichtung bei der Beschreibung der Fig. 9 erfolgen sollen.

Die Basis für diesen neuartigen Assay bildet wieder der kompetitive Assay. Das Gemisch aus freien und gebundenen markierten analytischen Antikörpern Ak wird durch eine Membran 22, auf deren Oberfläche das entsprechende Antigen Ag immobilisiert ist, geführt. Als Membranmaterial kann beispielsweise eine Nitrocellulosemembran verwendet werden. An die dort immobilisierten Antigene Ag binden ausschließlich die freien markierten analytischen Antikörper Ak an, während die bereits gebundenen die Membran 22 passieren. Die Flüssigkeit im Anschluß an die Membran 22 wird mit einer Oberfläche O in Kontakt gebracht, auf der ein Protein P immobilisiert ist. Dieses Protein ist in der Lage unabhängig von der Spezifität des verwendeten markierten analytischen Antikörpers Ak, diesen zu erkennen und zu binden. Als Protein P kann beispielsweise Protein A oder ein anti-Antikörper eingesetzt werden. Das bei diesem Assay erhaltene Fluoreszenzintensitätssignal verhält sich entsprechend dem Sandwichassay und die Empfindlichkeit ist demzufolge größer und die mögliche Nachweisgrenze entsprechend klein.

In der Fig. 5 ist der prinzipielle Aufbau eines Teiles der erfindungsgemäßen Vorrichtung dargestellt. Die dort abgebildeten drei Teile, die Bodenplatte 1, der Abstandshalter 4 und die Deckplatte 3, können vor der Durchführung des Fluoreszenzimmuntestes miteinander verbunden werden oder bilden bereits eine fertig komplettierte Einheit und gleichen in ihrem Aufbau einer Durchflußzelle und einer Meßküvette.

Dabei besteht die Bodenplatte 1 aus einem hochbrechenden transparenten Material, wie beispielsweise Glas oder einem Kunststoff, wie einem Polymer (PMMA oder PC) mit einem Brechungsindex  $n_1 > 1,33$ . Die Dicke der Bodenplatte kann in einem Bereich von 0,01 bis 10 mm, bevorzugt zwischen 0,5 und 1 mm liegen.

Der Abstandshalter 4 ist bevorzugt eine dünne Folie, die beidseitig mit einem Klebefilm versehen ist, oder ein dünner Klebefilm und so einmal auf die Bodenplatte 1 und zum anderen auf die Deckplatte 3 klebbar. Die gesamte Dicke des Abstandshalters inklusive des verwendeten Klebmittels sollte in einem Bereich zwischen 0,001 bis 10 mm, bevorzugt zwischen 0,01 und 0,2 mm und ganz besonders bevorzugt bei einer Dicke von 50 µm liegen. In den Abstandshalter 4 ist eine Durchbrechung herausgearbeitet, die einen küvettenförmigen Aufnahmebereich 2 ausbildet.

In der Fig. 5 ist außerdem die Deckplatte 3 in der durchgehende Öffnungen 9 und 11, bei diesem Beispiel als Bohrungen ausgebildet, erkennbar. Auf deren Funktion wird später noch zurückzukommen sein. Die Öffnungen 9 und 11 sind dabei so angeordnet, daß sie zumindest teilweise den Bereich des Aufnahmebereiches 2 des Abstandshalters 4 übergreifen. Der Abstandshalter 4 kann vorzugsweise auch aus einem biokompatiblen Klebefilm, der bevorzugt beidseitig mit einer abziehba-

ren Schutzschicht versehen ist und bereits kommerziell erhaltbar ist, bestehen.

In der Fig. 6 ist der prinzipielle Aufbau einer erfindungsgemäßen Vorrichtung erkennbar. Dabei wird Licht einer Laserdioden 7 durch einen Polarisator 18, durch einen Anregungsfilter 19, der optisch schmalbandig ausgebildet ist, auf den im Abstandshalter 4 ausgebildeten Aufnahmebereich 2 für die Probe durch die Bodenplatte 1 gerichtet. Neben der Totalreflexion an der Grenzfläche 20 zwischen Bodenplatte 1 und Aufnahmebereich 2 erfolgt im Aufnahmebereich 2 eine Evanescentfeldanregung, die Fluoreszenz der als Markierungsstoff verwendeten Fluorophore hervorruft. Das Fluoreszenzlicht gelangt von dort über einen Kolimator 16 durch ein breitbandiges Filter 8, mit dem Streulicht der Laserdioden 7 vom Detektor 5 ferngehalten wird, bei diesem Beispiel durch den dem Filter 8 nachgeordneten Polarisator 6 auf den Detektor 5, dem eine Blende 17 vorgeschaltet ist. Mit dem Detektor 5 wird die Fluoreszenzintensität erfaßt und demzufolge der Fluoreszenzimmuntest durchgeführt und eine entsprechende quantitative Bestimmung ermöglicht.

Das in der Fig. 7 dargestellte Beispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung entspricht im wesentlichen dem vorab beschriebenen, in der Fig. 6 gezeigten Beispiel. Hierbei ist zusätzlich lediglich eine zweite Lichtquelle 7', ein Filter 19' und ein Polarisator 18' vorhanden. Die Lichtquelle 7' sendet Licht einer Wellenlänge, die sich von der ersten Lichtquelle 7 unterscheidet. Auch bei diesem Beispiel wird vorzugsweise polarisiertes Licht verwendet. Die in der Fig. 7 gezeigte Vorrichtung kann vorteilhaft eingesetzt werden, wenn unterschiedliche Markierungsstoffe, die bei verschiedenen Wellenlängen angeregt werden können, verwendet werden. Beispiele hierfür sind die Fluorophore Cy5 und Cy7. Dabei wird zur Anregung des Fluorophors Cy5 eine Laserdioden mit einem Licht einer Wellenlänge zwischen 635 und 655 nm und für die Fluorophore Cy7 eine Laserdioden, die Licht mit einer Wellenlänge zwischen 730 bis 780 nm sendet, verwendet.

Die Messung erfolgt bei dieser Ausführungsform in der Weise, daß die Dioden 7, 7' entweder alternierend geschaltet oder beispielsweise entsprechend synchronisierte Chopper eingesetzt werden, so daß gesichert ist, daß jeweils nur Licht einer Lichtquelle 7 oder 7' zur Anregung auf die Probe gelangen kann und dadurch keine Verfälschungen auftreten.

Da aber hierbei zwei verschiedene Fluoreszenzsignale das gleiche Filter passieren müssen, kann ein breitbandiges Filter 8 nicht mehr verwendet werden. Es sollten daher zwei Filter 8, 8' nacheinander angeordnet werden, die selektiv die Wellenlängen der anregenden Lichtquellen 7, 7' sperren. Hierfür können z. B. Notch-Filter verwendet werden.

Mit dieser Anordnung kann einmal ein Referenzsignal erhalten werden, das eine interne Kalibrierung des Meßsignals ermöglicht. Zur Referenzmessung wird ein Referenzantikörper, der nicht gegen ein Antigen aus der Probe gerichtet ist, verwendet. Der Referenzantikörper ist vorab quantifiziert und mit einem unterschiedlichen Markierungsstoff vom zu bestimmenden analytischen Antikörper Ak unterscheidbar gemacht. Die Menge der an die Oberfläche tatsächlich gebundenen Referenzantikörper kann mit einer zweiten Lichtquelle 7', die Licht einer Fluoreszenz des unterschiedlichen Markierungsstoffes hervorruft, einem zweiten Streulichtfilter 8' und dem Detektor 5 bestimmt werden. Mit dieser Bestimmung können die Verluste der nicht an die



Oberfläche gebundenen markierten analytischspezifischen Antikörper Ak bzw. Antigene Ag berücksichtigt werden.

Neben der Gewinnung eines Referenzsignales können aber auch zwei unabhängig voneinander laufende Immunotests durchgeführt werden, wobei die Unterscheidung an Hand der unterschiedlichen Fluorophore erfolgt.

Vorteilhaft kann eine lineare oder flächenhafte Anordnung von lichtempfindlichen Detektoren als Detektor 5 verwendet werden. Dadurch können parallel mehrere Analyte detektiert werden, wenn im Aufnahmebereich 2 an unterschiedlichen Orten je nach biochemischen Assay entweder unterschiedliche Antigene beim kompetitiven Assay oder unterschiedliche analytischspezifische Antikörper beim Sandwichassay immobilisiert werden und entsprechend der Menge der unterschiedlichen Antigene oder Antikörper unterschiedlich markierte analytischspezifische Antikörper sich im Probencontainer 10 befinden. Die unterschiedlich markierten analytischspezifischen Antikörper werden entsprechend des biochemischen Assay an unterschiedlichen Orten im Aufnahmebereich 2 anbinden und durch die Abbildung des Fluoreszenzlichtes mit Hilfe des Kollimators 16 auf die lineare oder flächenhafte Anordnung von mehreren lichtempfindlichen Detektoren wird das Fluoreszenzlicht ortsaufgelöst detektiert. Dies ermöglicht bei der Verwendung von nur einem Markierungsstoff, wie z. B. Cy5 die unabhängige und parallele Quantifizierung von mehreren Analyten aus einer Probe. Der in den Figuren dargestellte Detektor 5 wird dann durch eine entsprechende Anordnung mehrerer lichtempfindlicher Detektoren gebildet.

In der Fig. 8 ist dargestellt, wie ein Probencontainer 10 zur Öffnung 9 in der Deckplatte 3 angeordnet ist und so eine Verbindung zwischen Probencontainer 10 über Öffnung 9 zum Aufnahmebereich 2 herstellbar ist. Dabei bildet der Probencontainer 10 den Behälter, in dem die bekannte Menge mit dem Markierungsstoff Fluorophor markierter Antikörper Ak in der zu bestimmenden Probe vermischt werden. Dabei ist es wesentlich, daß der Probencontainer 10 das Probenvolumen eindeutig definiert und nur so mit einem festen und bekannten Probenvolumen eine quantitative Aussage über die Antigenkonzentration erhalten werden kann. Der Probencontainer 10 muß daher immer mit der gleichen Menge befüllt werden, um reproduzierbare Ergebnisse erhalten zu können. Günstig sollte er dabei immer maximal befüllt werden. Bei allen durchführbaren Assayformaten befindet sich der spezifische Antikörper Ak jeweils auf der Oberfläche des Probencontainers 10 und durch den Kontakt mit der flüssigen Probe löst sich dieser von der Oberfläche und gelangt in die Probe. Eine einfache und bereits bekannte Methode besteht darin, lyophilisierte Antikörper auf die Oberfläche des Probencontainers 10 aufzubringen. Dadurch wird es möglich, das Ganze relativ lange vor der eigentlichen Durchführung des Immunotests zu lagern. Der Aufnahmebereich 2 definiert die Oberfläche auf der Bodenplatte 1, auf der je nach Assayformat die jeweils entsprechenden chemischen oder biochemischen Substanzen immobilisiert werden.

In der Fig. 8 ist ebenfalls ein zylinderförmiger Hohlkörper 12, in dem ein Kolben 13 aufgenommen ist, dargestellt, die beide zusammen als Pumpe dienen. Wird der Kolben 13 aus dem zylinderförmigen Hohlkörper 12 herausbewegt, entsteht ein Unterdruck, der Probenmaterial aus dem Probencontainer 10 durch den Aufnahmebereich 2 in Richtung auf den zylinderförmigen

Hohlkörper 12 saugt. Durch Kapillarkräfte im Aufnahmebereich 2 und durch ein saugfähiges Vlies wird der Fluß aufrechterhalten, bis das gesamte Probenvolumen durch den Aufnahmebereich 2 gefördert worden ist. Der zylinderförmige Hohlkörper 12 ist aufgesetzt oder hat ein Loch im Boden, so daß eine Verbindung zum Aufnahmebereich 2 vorhanden ist. Dies kann durch die zweite Öffnung 11 in der Deckplatte 3 realisiert werden.

Es kann aber auch an die Öffnung 11 eine externe andere Pumpe angeschlossen werden.

Nach Aufbringen der Probe (mit dem Probencontainer 10) muß eine entsprechende Zeit gewartet werden, so daß die gewünschte Bindung zwischen den Antigenen Ag und den markierten Antikörpern Ak vollständig erfolgen kann. Im Anschluß daran wird die Pumpe 12, 13 aktiviert und es wird gewartet, bis die gesamte Flüssigkeit durch den Aufnahmebereich 2 gepumpt worden ist. Nach Anregung mit der Lichtquelle 7 bzw. den Lichtquellen 7 und 7' kann dann die Antigenkonzentration bestimmt werden, wobei der erfindungsgemäße Aufbau, wie er in den Fig. 6 und 7 dargestellt worden ist, angewendet werden soll.

Der Aufbau, wie er bisher dargestellt und beschrieben worden ist, kann für die verschiedensten biochemischen Assays genutzt werden.

Beim kompetitiven Assay befinden sich im Probencontainer 10 nicht immobilisierte mit einem Fluorophor markierte analytischspezifische Antikörper Ak und im Aufnahmebereich 2 auf der Bodenplatte 1, die aus dem hochbrechenden Glas oder einem Polymer oder anderem geeigneten Kunststoff besteht, ist das entsprechende Antigen Ag immobilisiert.

Die Probe wird dann in den Probencontainer 10 gefüllt und der Analyt bindet sich an den markierten Antikörper Ak. Nach der Reaktion wird die Pumpe 12, 13 aktiviert und die noch freien markierten Antikörper binden an das immobilisierte Antigen Ag im Aufnahmebereich 2 auf der Bodenplatte 1. Die entsprechende Menge an markierten analytischspezifischen Antikörpern Ak mit der Messung der Fluoreszenzintensität kann quantifiziert werden, wie dies bereits beschrieben worden ist.

Ein weiteres biochemisches Assay, kann wie folgt durchgeführt werden. Auf dem Boden des Probencontainers 10 befindet sich eine Membran (nicht dargestellt), auf der das Antigen Ag immobilisiert ist und an den Wänden des Probencontainers 10 befinden sich lyophilisierte mit einem Fluorophor markierte analytischspezifische Antikörper Ak. An der Oberfläche der Bodenplatte 1, die aus einem bereits bezeichneten Material besteht, ist z. B. ein anti-Antikörper oder Protein A, der gegen den analytischspezifischen Antikörper Ak gerichtet ist, immobilisiert. Die Probe wird dann in den Probencontainer 10 gefüllt und die Antikörper Ak binden an den Analyten. Nach der Reaktion wird die Pumpe 12, 13 aktiviert und die noch freien Antikörper Ak binden an die Antigene Ag auf der Membran. Die analytischgebundenen Antikörper werden auf der Oberfläche im Aufnahmebereich 2 gebunden und die entsprechende Menge kann dann, wie bereits beschrieben, unter Ausnutzung der Evaneszenzfeldaanregung quantifiziert werden.

Wichtig ist bei allen biochemischen Assays, daß sich im Probencontainer 10 ein relativ großes Probenvolumen befindet, das vollständig an der kleinen, durch den Aufnahmebereich 2 gebildeten Meßoberfläche vorbei gepumpt wird. Da die Höhe des Aufnahmebereiches 2 verhältnismäßig klein ist, kann davon ausgegangen werden, daß die entsprechenden Antikörper Ak (freie beim kompetitiven Assay und gebundene beim Sandwichas-

say) mit Sicherheit durch die Prozesse Konvektion und Diffusion an die Oberfläche gelangen und dies über einen großen Bereich an Flußgeschwindigkeiten der Fall ist. Dadurch kann einmal eine Anreicherung der Antikörper Ak an der Oberfläche und zum anderen eine stabile Betriebssicherheit erreicht werden, so daß der Prozeß nahezu unabhängig von der Geschwindigkeit der Durchströmung ist.

In der Fig. 9 ist ein weiteres mögliches Ausführungsbeispiel der Vorrichtung wiedergegeben, mit dem biochemische Assays durchgeführt werden können, wie das bereits bei der Beschreibung der Fig. 4 prinzipiell beschrieben worden ist.

Dabei wird zusätzlich eine in den Probencontainer 10 einpreßbare Hülse 15 verwendet. Die Hülse 15 ist nach unten mit einer Membran 23 abgeschlossen. Auf der Oberfläche der Innenseite der Hülse 15 befindet sich der lyophilisierte analytischspezifische Antikörper und ggf. der Referenz-Antikörper und auf der Membranoberfläche ist das entsprechende Antigen immobilisiert. In diesem Zustand kann das Ganze über eine längere Zeit gelagert werden. Für die Durchführung dieses Tests nach den Fig. 4 und 9, wird bevorzugt die in der Fig. 7 dargestellte Vorrichtung eingesetzt, wobei die unterschiedlichen Antikörper Ak bzw. der Referenz-Antikörper mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert werden. Die Quantifizierung erfolgt dann in der bereits beschriebenen Form.

Auch bei dem in Fig. 9 gezeigten Beispiel kann wieder ein zylinderförmiger Hohlkörper 12 mit eingesetztem Kolben 13 verwendet werden, wie dies bereits bei dem in Fig. 8 gezeigten Beispiel beschrieben worden ist.

#### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Durchführung von Fluoreszenzimmunotests mittels Evanescentfeldanregung, mit mindestens einer nahezu monochromatisches Licht aussendenden Lichtquelle (7, 7'), die Lichtstrahlen mit einer Fluoreszenz eines am Antikörper gebundenen Markierungsstoffes hervorrufenden Wellenlänge, in einem durch eine vorgebbare Eindringtiefe  $d$  für das evanescente Feld bestimmenden Winkel  $\alpha$  auf eine Grenzfläche (20) zwischen einer optisch transparenten Bodenplatte (1) aus Material, dessen Brechungsindex  $n_1$  größer ist als der Brechungsindex  $n_2$  des Materials oberhalb der Grenzfläche (20), richtet,

dadurch gekennzeichnet,

daß das Licht auf einen küvettenförmig ausgebildeten Aufnahmebereich (2) gerichtet ist, ein Probencontainer (10) zur Aufnahme der Probe in eine erste Öffnung (9) einsetzbar oder so angeordnet ist, daß eine Verbindung zwischen küvettenförmigen Aufnahmebereich (2) und Probencontainer (10) gebildet ist und eine zweite Öffnung (11) in Verbindung mit dem küvettenförmigen Aufnahmebereich (2) steht, wobei der Aufnahmebereich (2) auf der entgegengesetzten zur Bodenplatte (1) angeordneten Seite mit einer Deckplatte (3) abgedeckt ist, und ein Detektor (5) zur Erfassung des Fluoreszenzlichtes gleichzeitig zur Bodenplatte (1), wie die Lichtquelle (7, 7') angeordnet ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der küvettenförmige Aufnahmebereich (2) eine Dicke zwischen 0,001 und 0,5 mm aufweist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch

gekennzeichnet, daß die Bodenplatte (1) und Deckplatte (3) mit einem Abstandhalter (4), in dem der küvettenförmige Aufnahmebereich (2) ausgebildet ist, verbunden sind.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle(n) (7, 7') eine oder mehrere Laserdiode(n) ist/sind.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichtquelle(n) (7, 7') polarisiertes Licht aussendet/aussenden und vor dem Detektor (5) ein Polarisator (6) angeordnet ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß im Strahlengang direkt hinter der/den Lichtquelle(n) (7, 7') jeweils ein optisches Filter (19, 19') angeordnet ist.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Detektor (5) mindestens ein optisches Filter (8, 8') angeordnet ist.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor (5) eine lineare oder flächige Anordnung mehrerer lichtempfindlicher Detektoren ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine zweite Lichtquelle (7') Licht einer Fluoreszenz eines zweiten Markierungsstoffes hervorrufenden Wellenlänge sendend vorhanden ist, und das Licht beider Lichtquellen (7, 7') alternierend auf den Aufnahmebereich (2) richtbar ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der/die Markierungsstoff(e) Fluorophore ist/sind.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Bodenplatte (1) aus optisch transparentem Material, wie Glas oder einem Kunststoff besteht.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß an die zweite Öffnung (11) eine Pumpe anschließbar oder an diese einsetzbar ist.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß in die zweite Öffnung (11) ein als Pumpe wirkender zylinderförmiger Hohlkörper (12) mit einem Kolben (13) einsetzbar ist.

14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß im Boden des zylinderförmigen Hohlkörpers (12) ein saugfähiges Material (14) angeordnet ist.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß in den Probencontainer (10) eine Hülse (15), an deren Innenwandung sich Antikörper befinden, einsetzbar ist.

16. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Hülse (15) nach unten mit einer Membran (23), auf der Antigene immobilisiert sind, abgeschlossen ist.

17. Verfahren zur Durchführung von Fluoreszenzimmunotests mittels Evanescentfeldanregung, bei dem ein Probenvolumen mittels Saug- oder Druckwirkung durch den küvettenförmigen Aufnahmebereich (2) geführt, die je nach biochemischen Assay zu bestimmenden Komponenten an der Oberfläche im Aufnahmebereich (2) gebunden und durch Evanescentfeldanregung mit einem Detektor (5) das Fluoreszenzlicht bestimmt wird; und eine Referenzmessung mit einem Referenzantikörper, der nicht gegen ein Antigen aus der Probe gerichtet ist und eine unterschiedliche Markierung gegen-

über dem analytischspezifischen Antikörper hat und dabei die Menge der Referenzantikörper durch die zweite Lichtquelle (7') und einem zweiten Streulichtfilter (8') mit dem Detektor (5) quantifizierbar ist, durchgeführt wird.

18. Verfahren zur Durchführung von Fluoreszenzimmunotests mittels Evanescentfeldanregung, bei dem ein Probenvolumen mittels Saug- oder Druckwirkung durch den küvettenförmigen Aufnahmebereich (2) geführt, die je nach biochemischen Assay zu bestimmenden Komponenten an der Oberfläche im Aufnahmebereich (2) gebunden und durch Evanescentfeldanregung mit einem Detektor (5) das Fluoreszenzlicht bestimmt wird; und zwei verschiedene an unterschiedliche Markierungsstoffe gebundene analytischspezifische Antikörper mit zwei Lichtquellen (7, 7'), die Licht mit Wellenlängen, die Fluoreszenz des jeweiligen Markierungsstoffes hervorrufen, bestimmt werden so daß zwei unterschiedliche Analyte aus einer Probe mit der Detektion der jeweiligen Fluoreszenzintensität quantifiziert werden.

19. Verfahren zur Durchführung von Fluoreszenzimmunotests mittels Evanescentfeldanregung, bei dem ein Probenvolumen mittels Saug- oder Druckwirkung durch den küvettenförmigen Aufnahmebereich (2) geführt, die je nach biochemischen Assay zu bestimmenden Komponenten an der Oberfläche im Aufnahmebereich (2) gebunden und durch Evanescentfeldanregung das Fluoreszenzlicht bestimmt wird; und im Aufnahmebereich (2) entsprechend dem durchzuführenden biochemischen Assay, an unterschiedlichen Orten unterschiedliche chemische oder biochemische Substanzen immobilisiert und entsprechend der Anzahl der Substanzen markierte analytischspezifische Antikörper im Probencontainer (10) enthalten sind, wobei die Detektion der unterschiedlichen Antigene aus der Probe mit mehreren linear oder flächenhaft angeordneten lichtempfindlichen Detektoren durchgeführt wird.

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

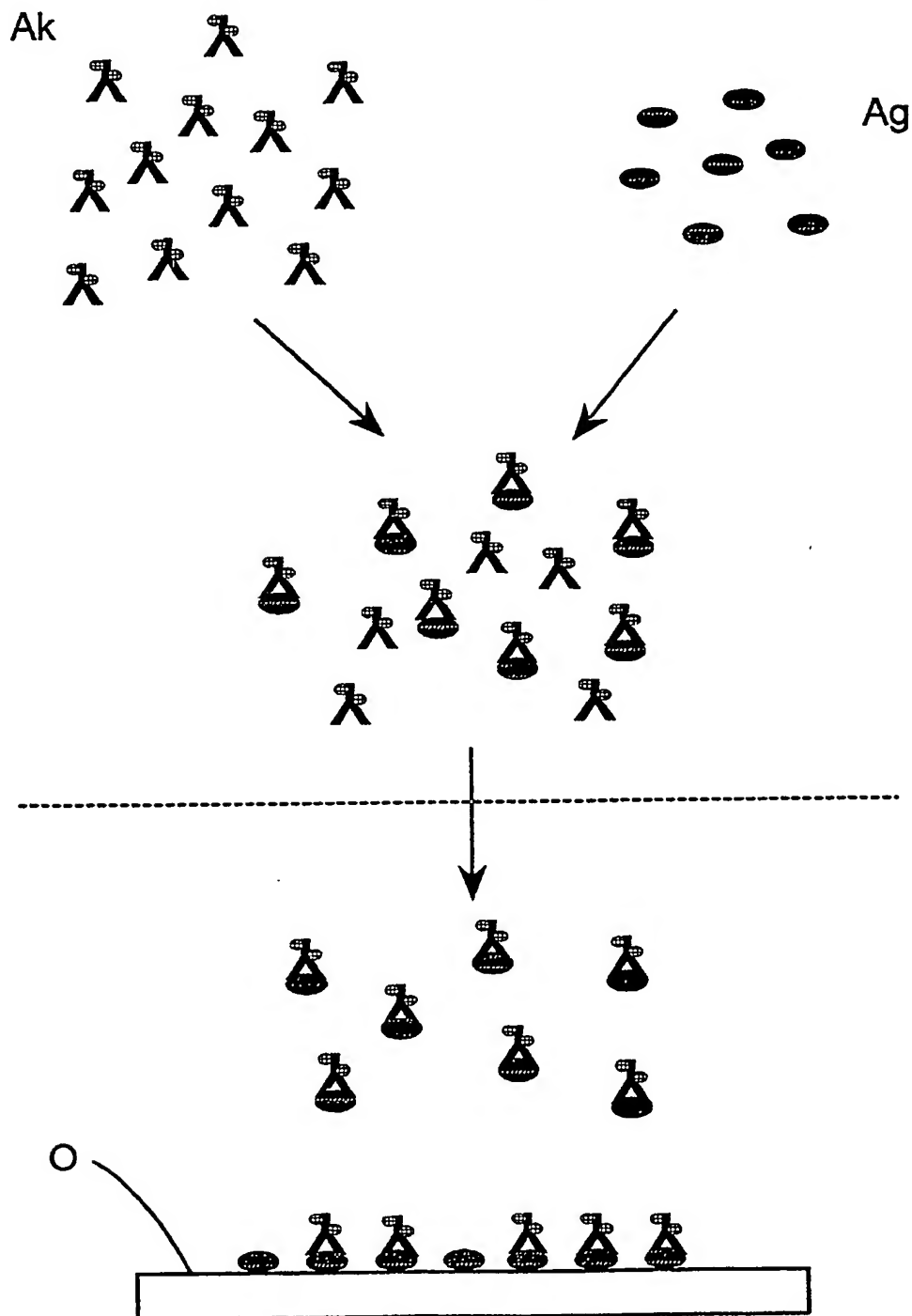
60

65

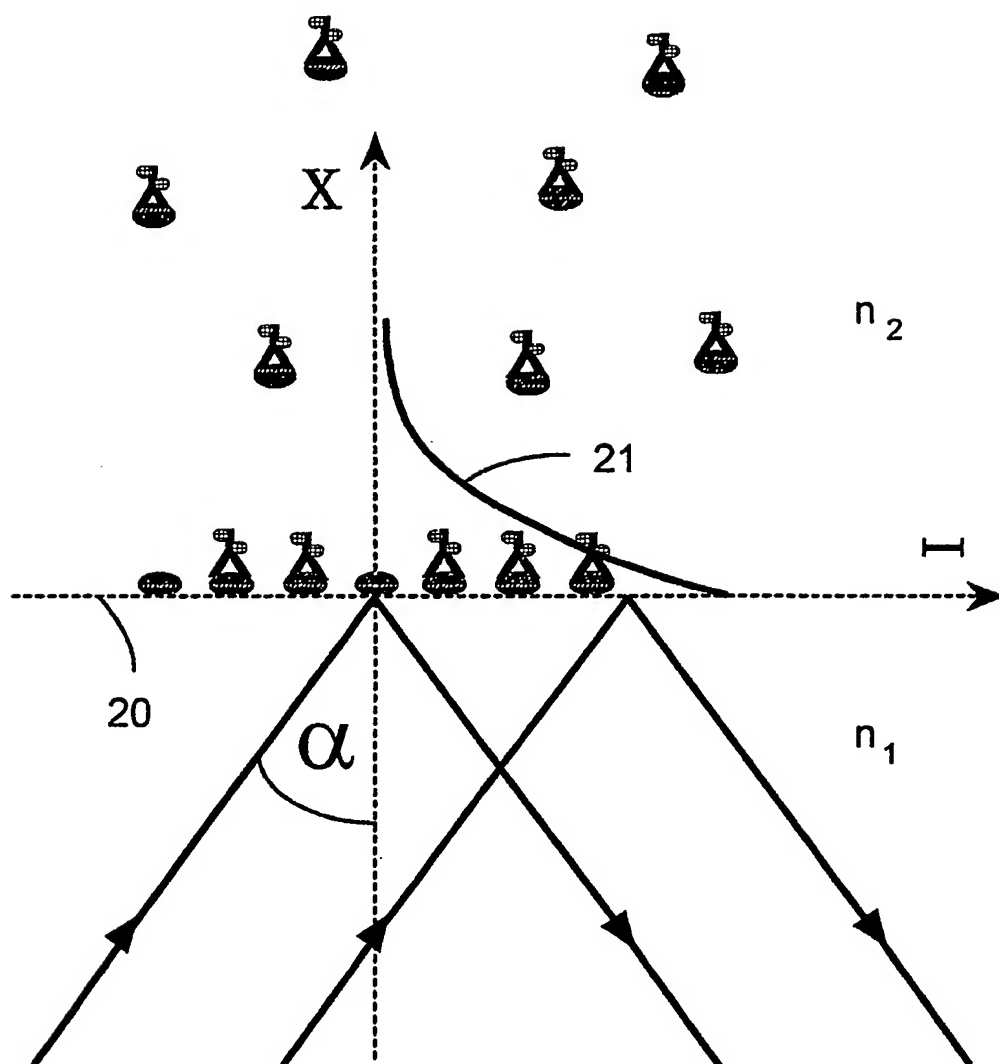


- Leerseite -

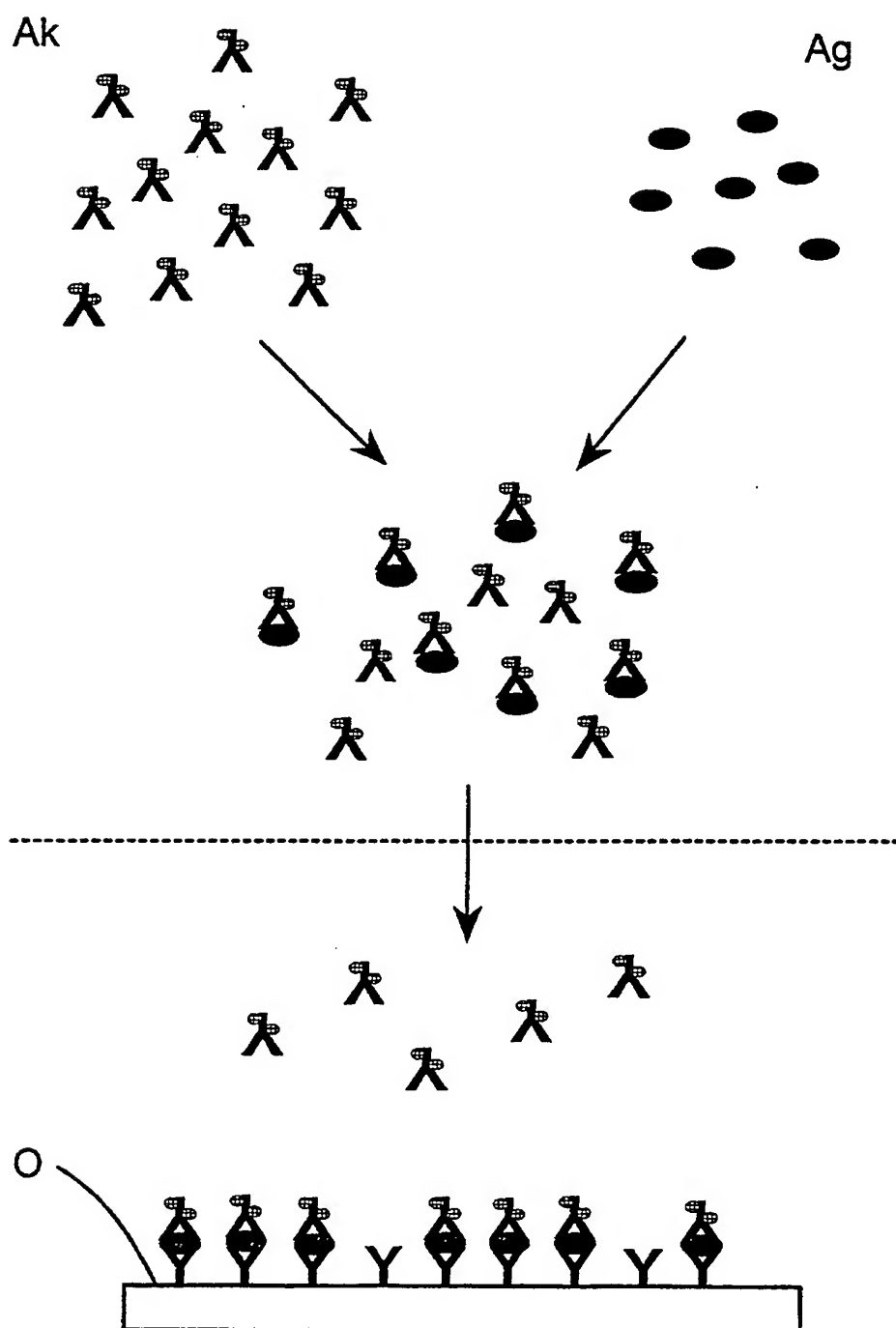
Figur 1



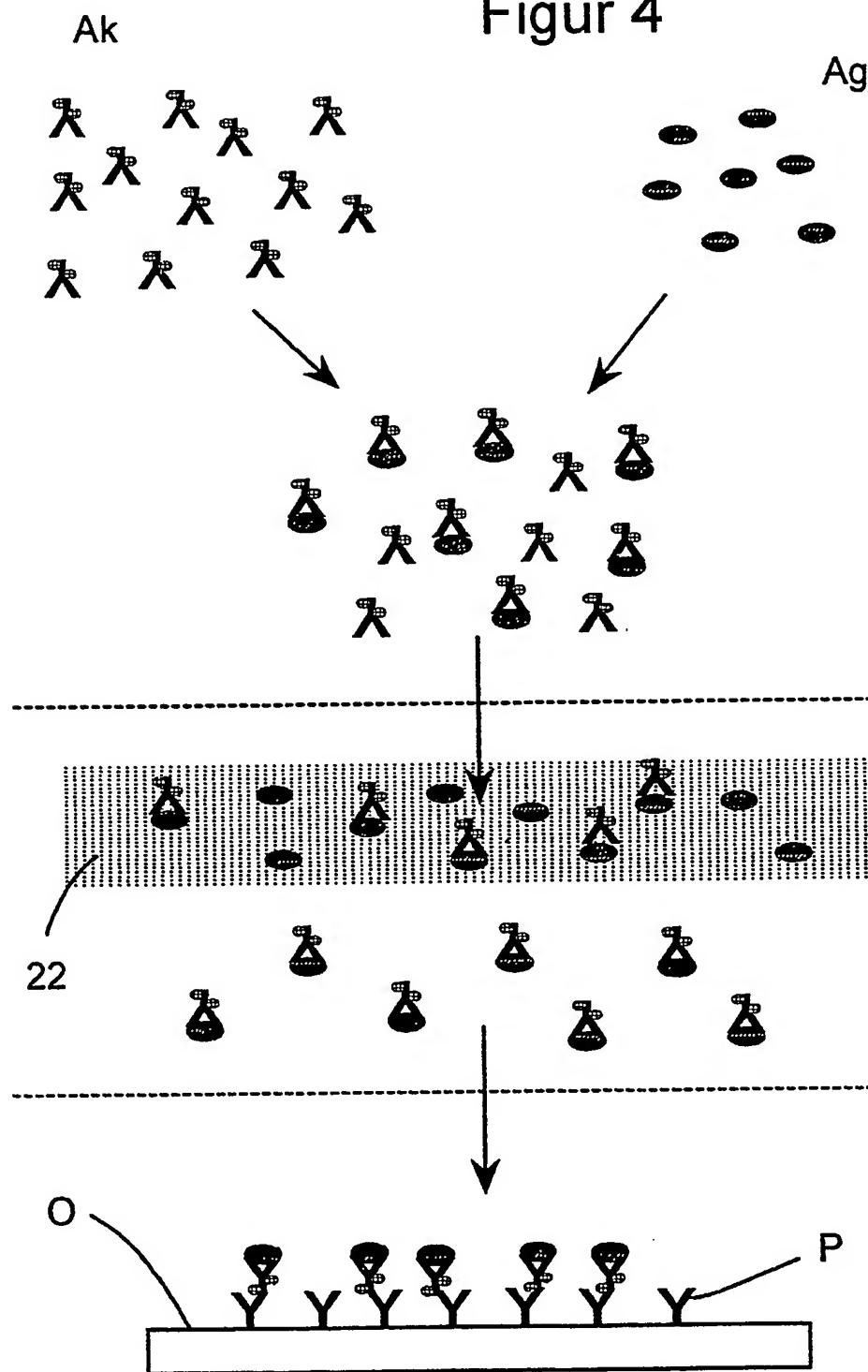
Figur 2



Figur 3



Figur 4



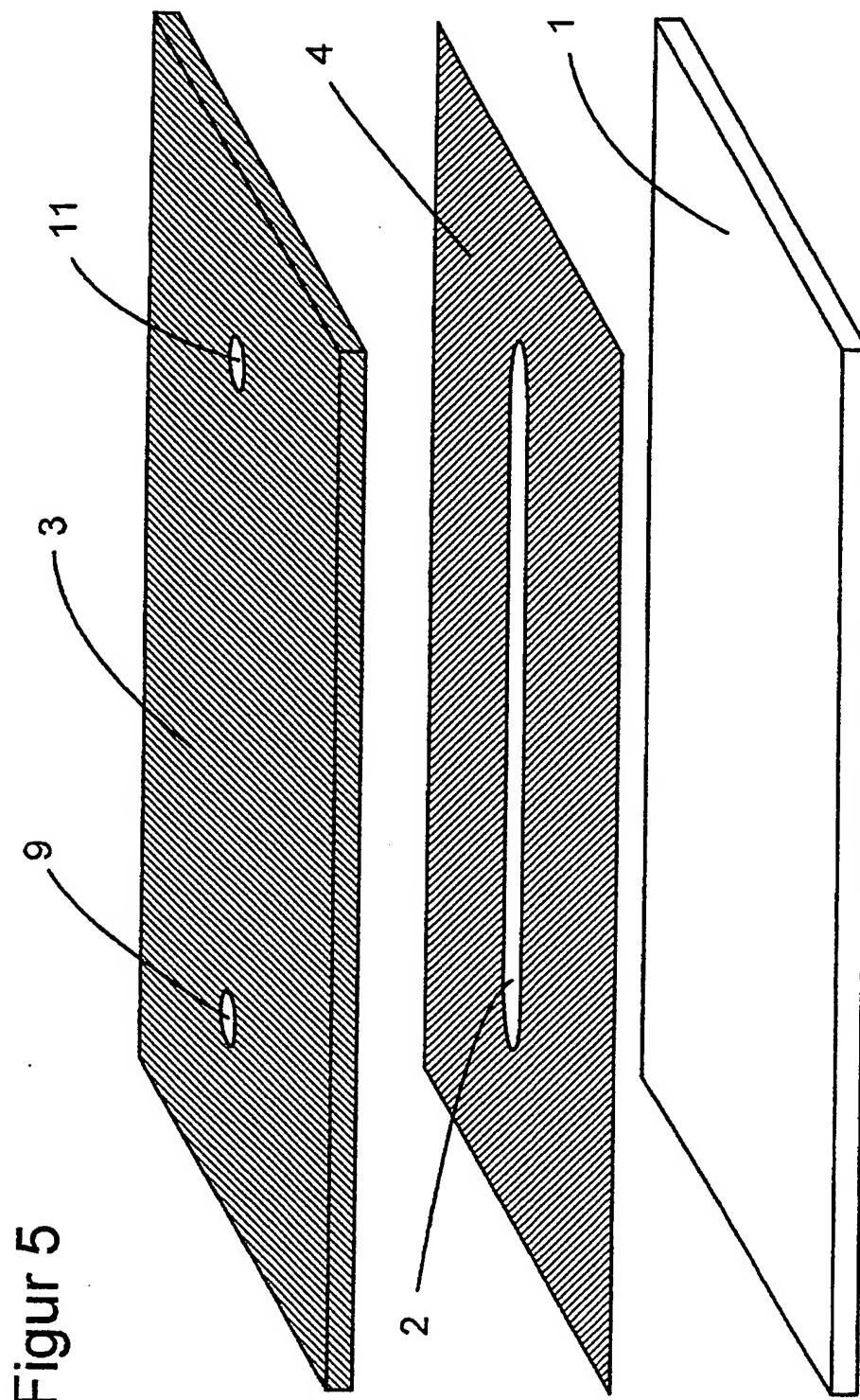
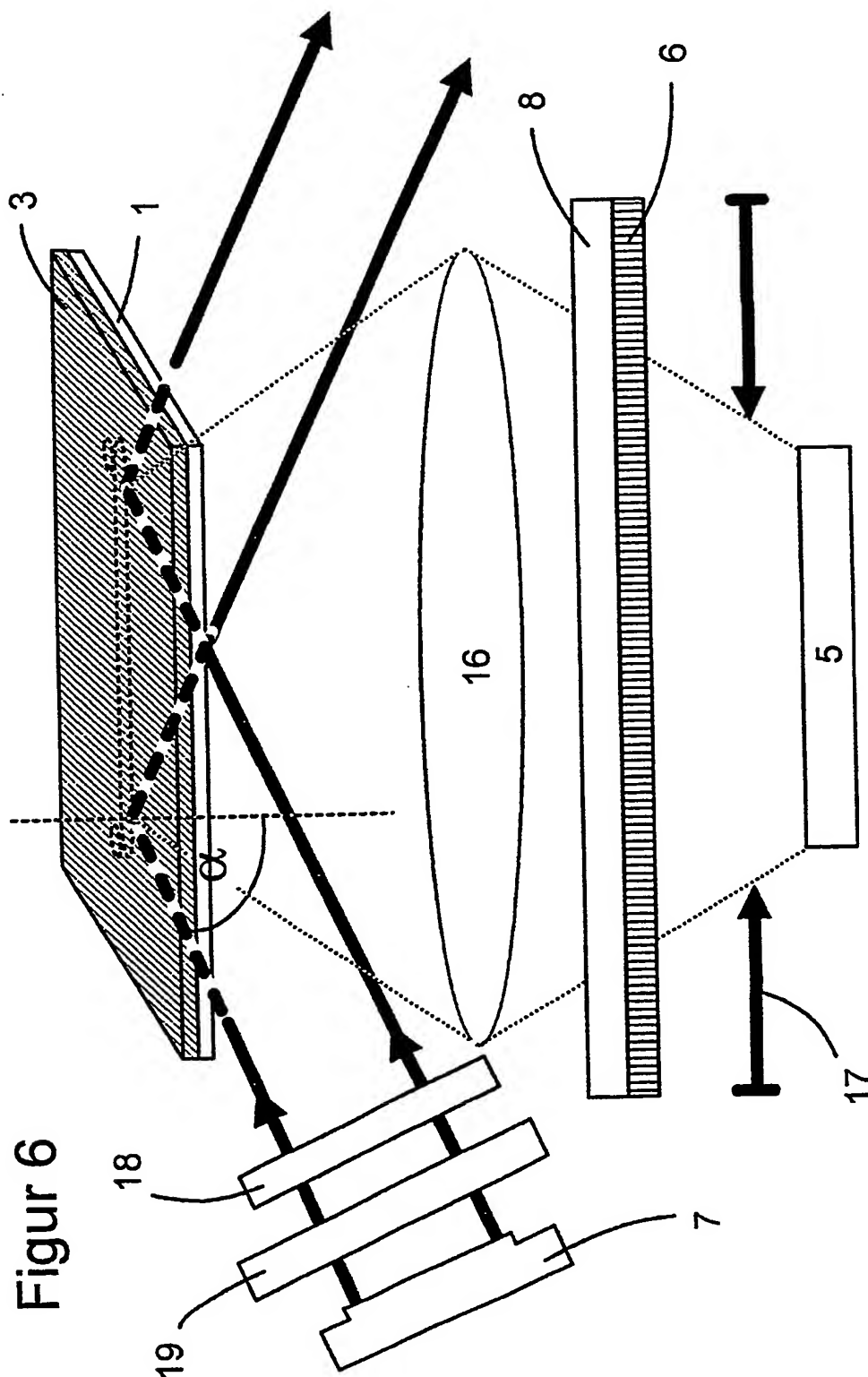
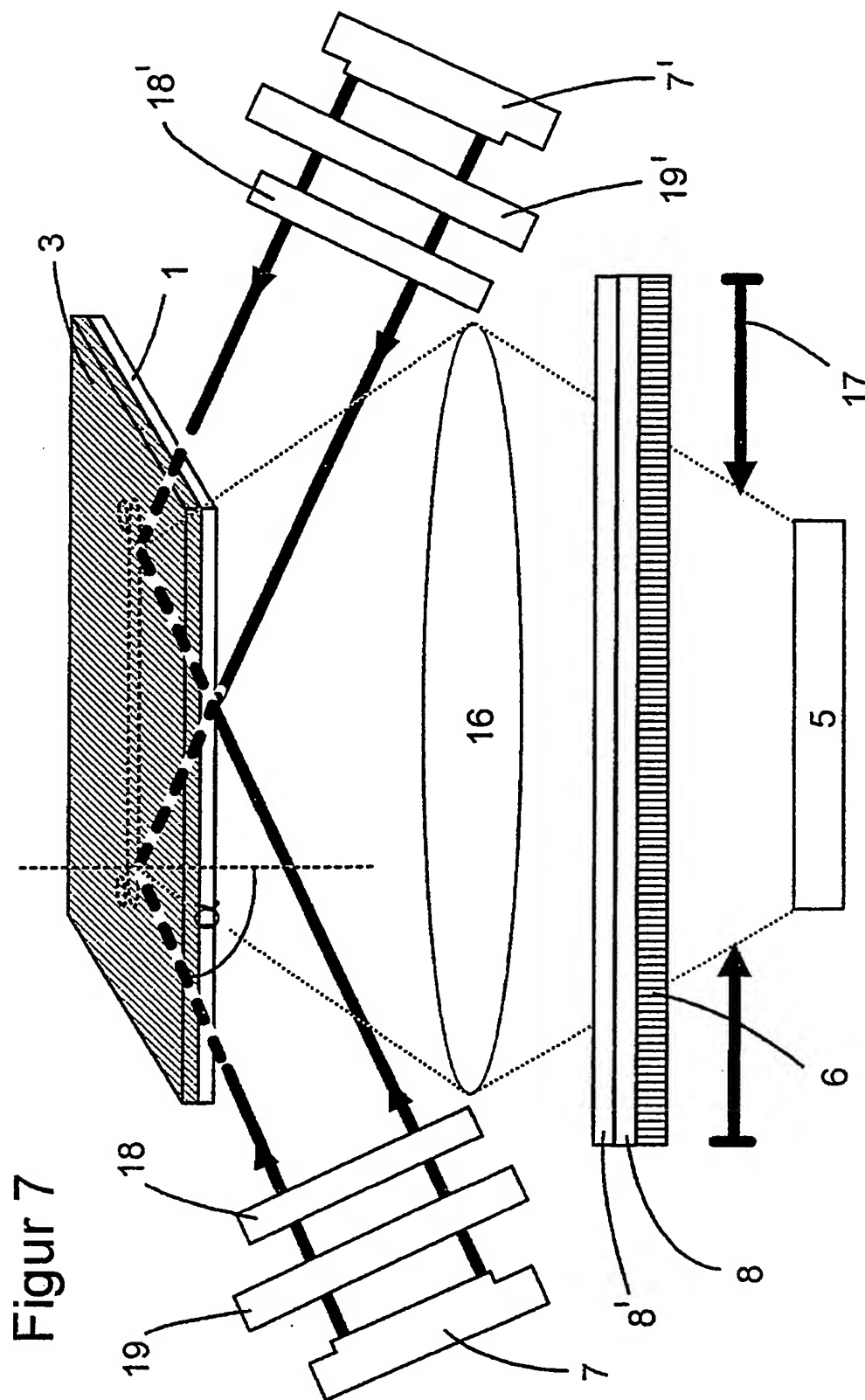


Figure 5

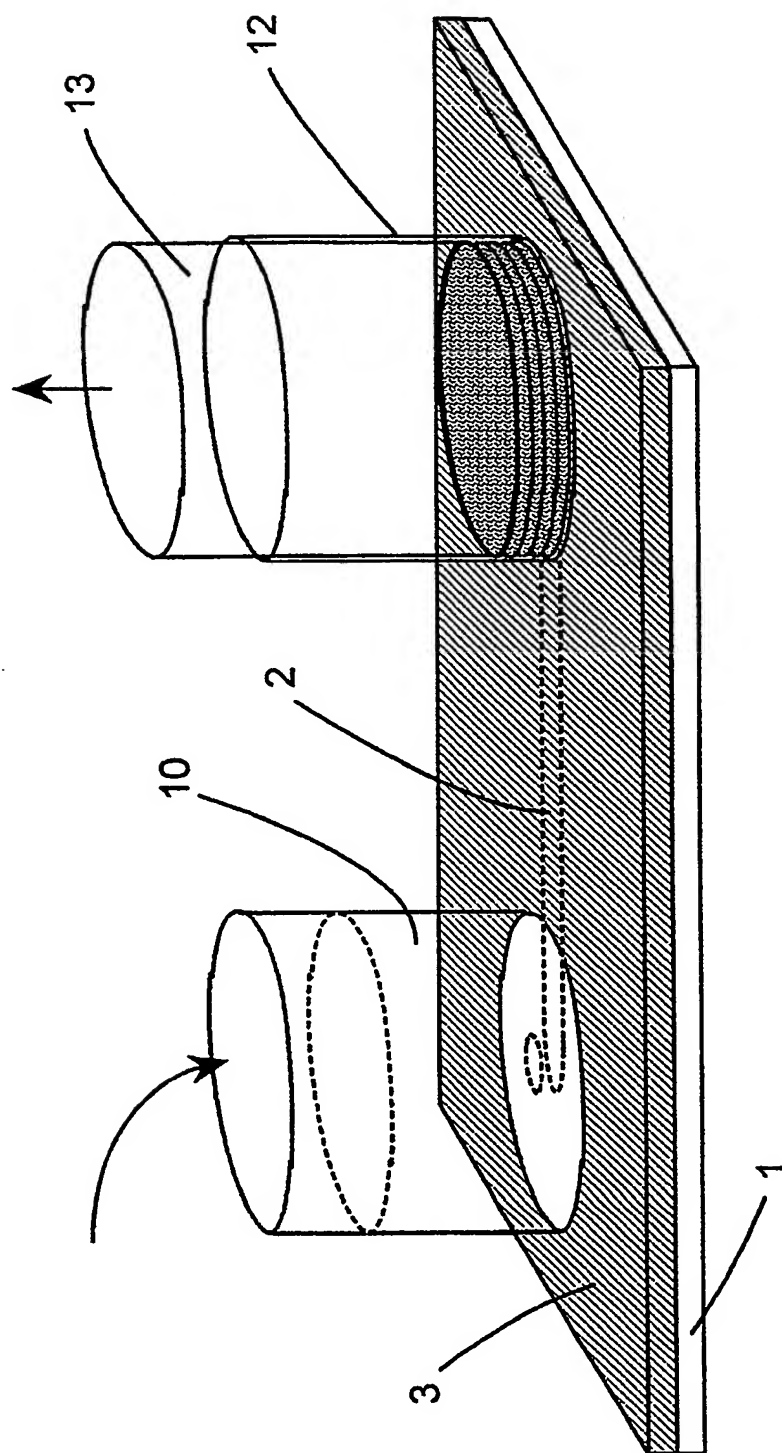




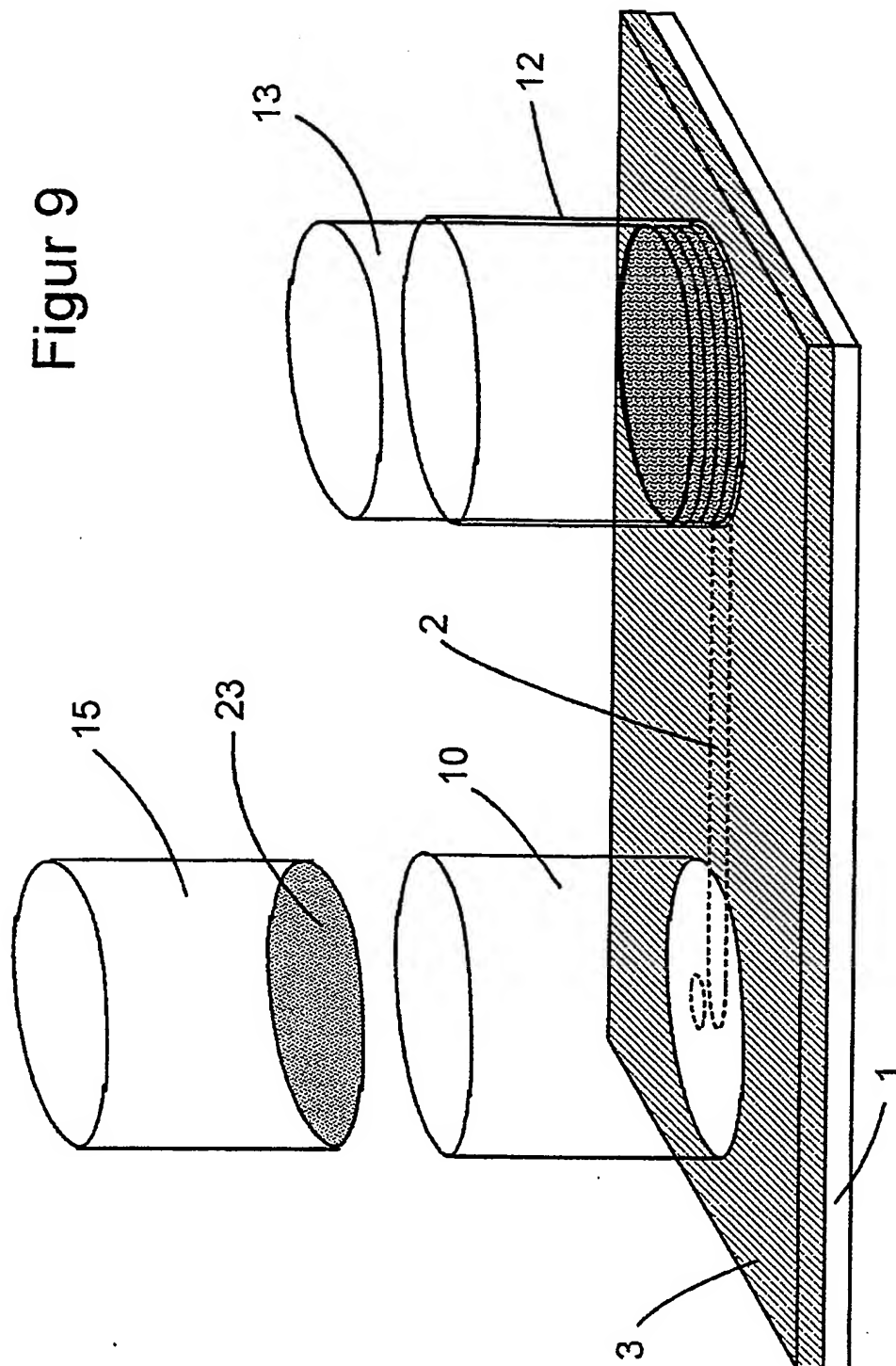
Figur 6



Figur 8



Figur 9



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**